



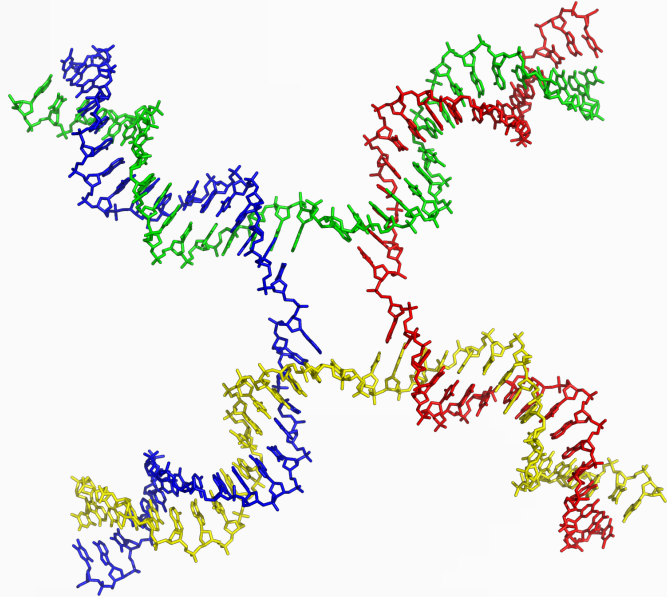
# CRISTALOGRAFÍA APLICADA A LA LUCHA FRENTE AL CÁNCER

Francisco Javier Arroyo Ródenas



## 1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es una de las enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad en nuestro planeta (1).

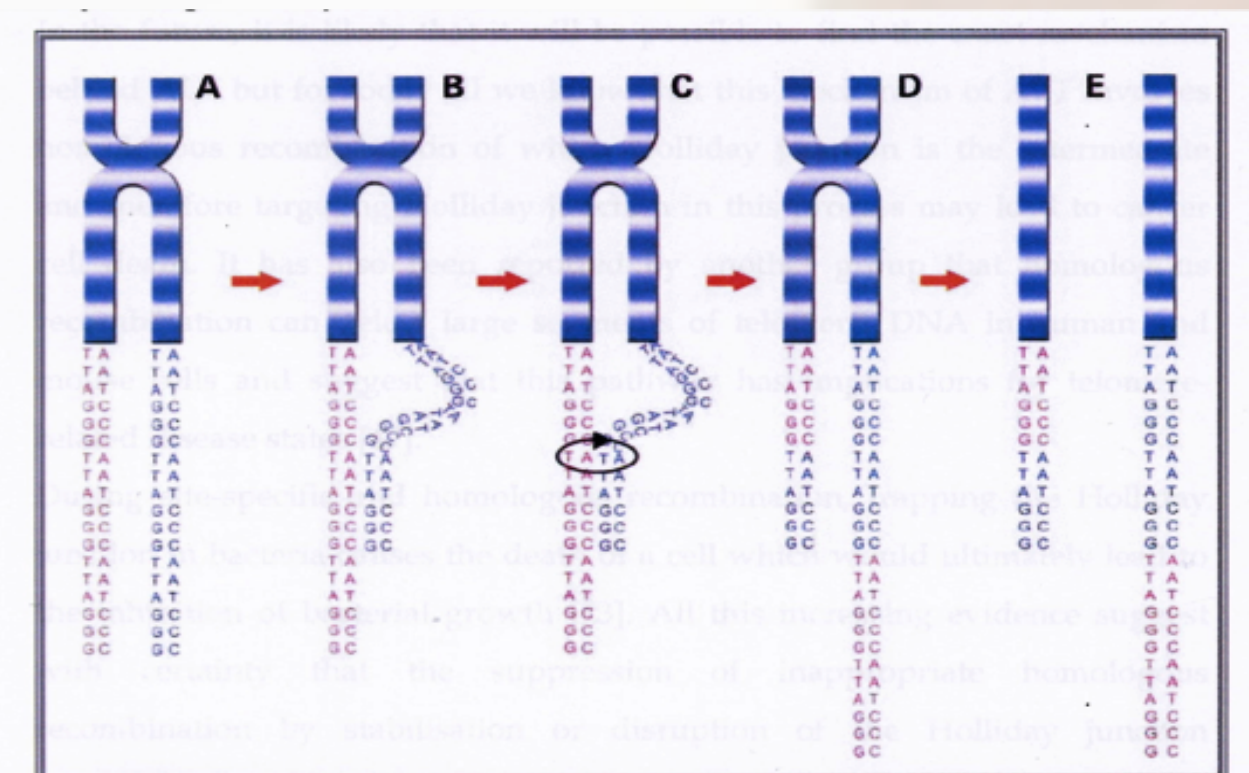


En el mecanismo de formación y expansión algunos tumores, puede estar implicada una estructura del DNA conocida como unión de Holliday o “Holliday junction”, que participa en procesos de reparación del DNA por recombinación homóloga (2).

Cuando se rompe una doble hélice de DNA, la unión de Holliday formada para repararla debe ser procesada para que la célula pueda dividirse. Su eliminación puede seguir dos vías (3, 4):

1. Disolución: Reparación de errores en las fases iniciales del ciclo celular sin dar lugar a entrecruzamientos.

2. Resolución: Reparación de errores en alguna de las fases de la división celular.

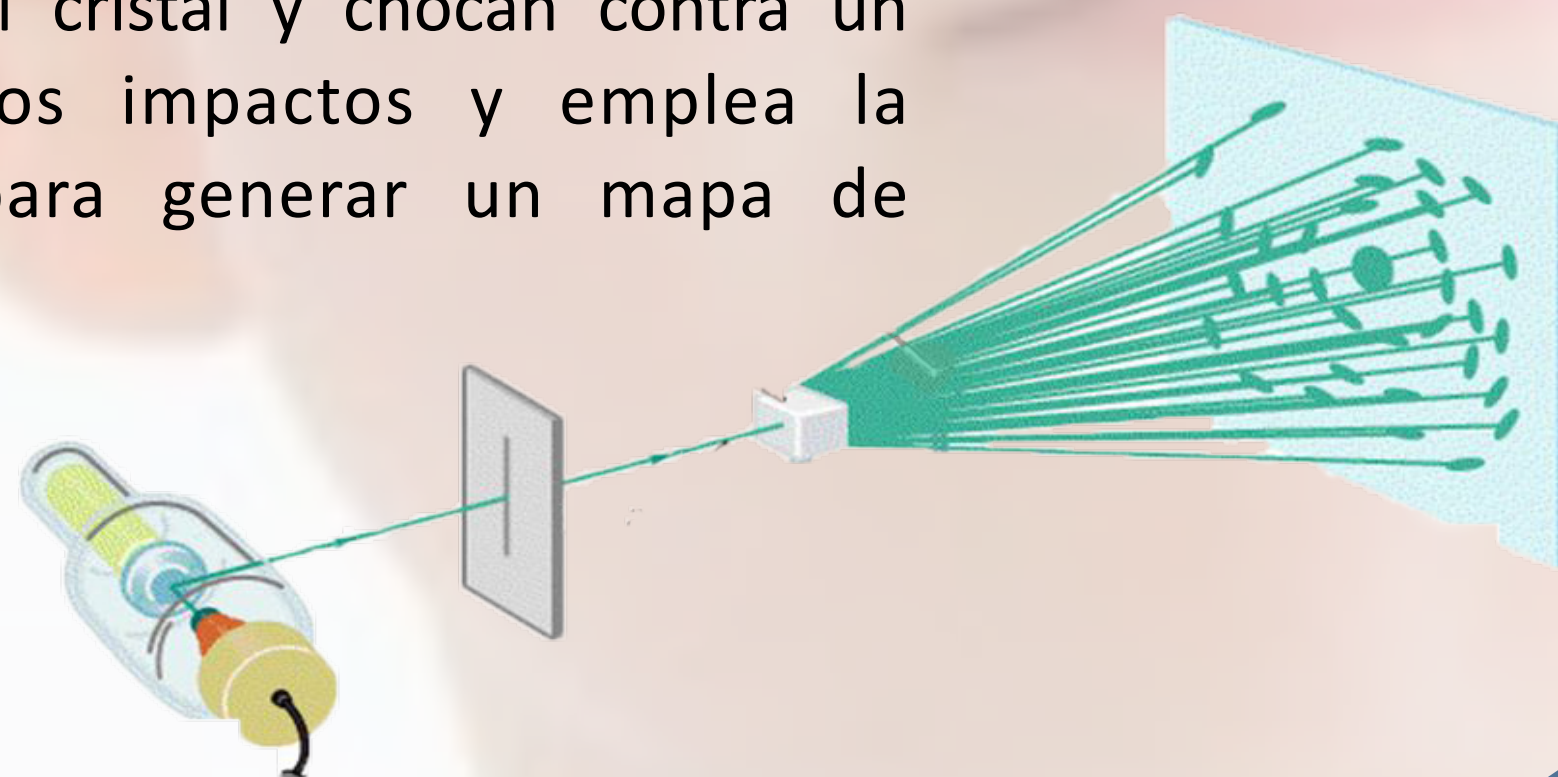


Para adquirir la capacidad de dividirse indefinidamente, algunas células emplean un mecanismo alternativo para alargar sus telómeros, formando una unión de Holliday como paso intermedio del proceso (5, 6).

Para diseñar fármacos que actúen sobre esta diana, es clave conocer perfectamente su estructura molecular. La cristalografía y la difracción de rayos X, combinadas, se han convertido en herramientas muy útiles para este fin.

Los rayos X emitidos por el difractor son desviados por los electrones de los átomos del cristal y chocan contra un detector, que registra los impactos y emplea la transformada de Fourier para generar un mapa de densidades electrónicas.

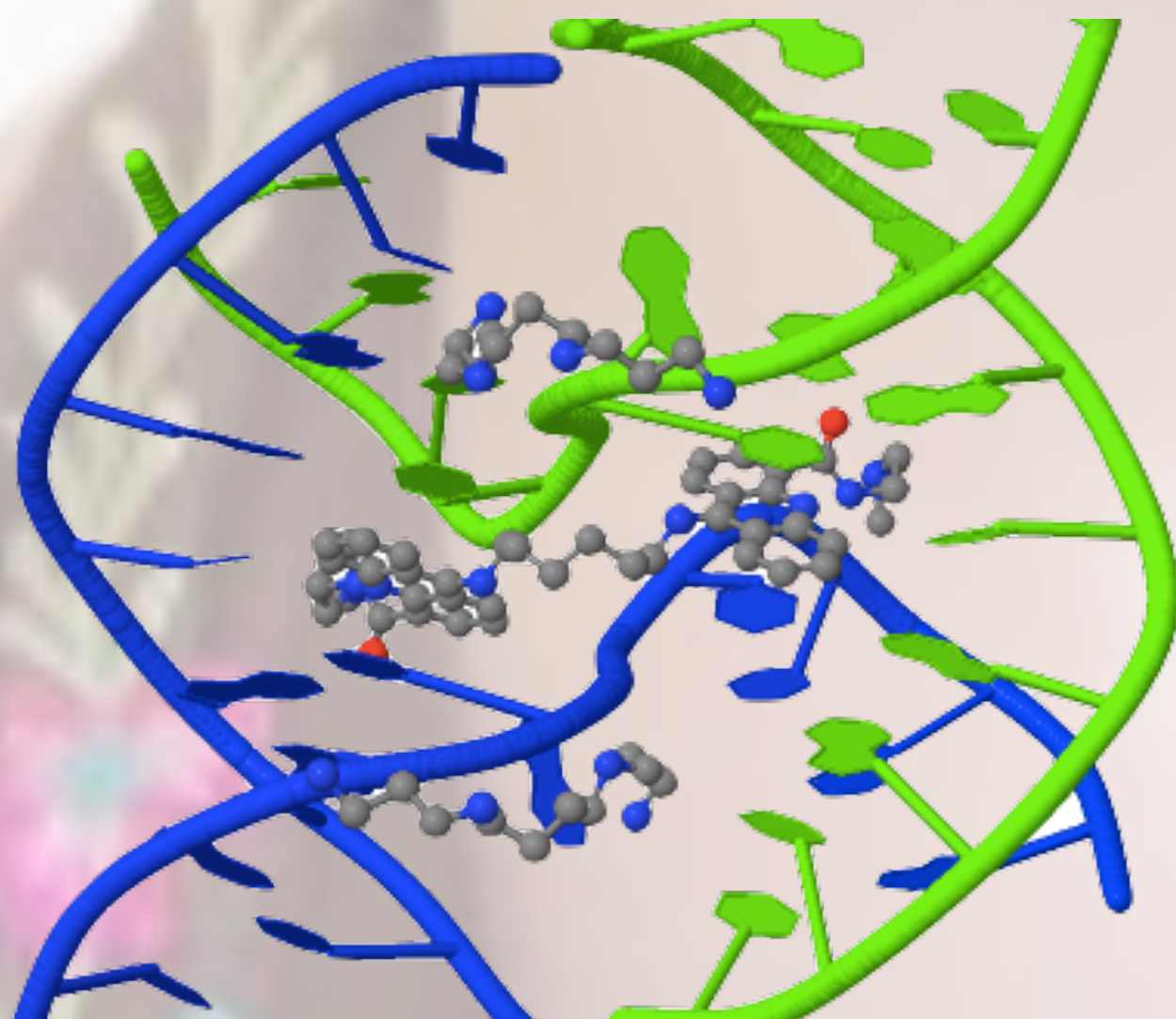
A partir de este mapa, el cristalógrafo es capaz de elucidar toda la estructura de la macromolécula (7).



## 5. CONCLUSIONES.

El éxito en la obtención de cristales de oligonucleótidos con la unión de Holliday, a pesar de la inestabilidad de esta estructura, nos permite afirmar que se han cumplido los objetivos propuestos inicialmente y avala a la cristalografía como técnica de elucidación estructural de macromoléculas.

Futuras investigaciones podrían ir encaminadas al diseño de diferentes ligandos capaces de unirse a ella para romperla o para fijarla e impedir su migración, algo que ya se ha logrado conseguir en una ocasión (9).



## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- OMS. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles en 2014. 15 de noviembre de 2015. <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>.
- Holliday, R. (1964) The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics*, **50**, 323-335.
- Matos, J. and West, S.C. (2014) Holliday junction resolution: regulation in space and time. *DNA repair*, **19**, 176-181.
- Liu, Y., Freeman, A.D., Declais, A.C., Wilson, T.J., Gartner, A. and Lilley, D.M. (2015) Crystal Structure of a Eukaryotic GEN1 Resolving Enzyme Bound to DNA. *Cell reports*, **13**, 2565-2575.
- Compton, S.A., Choi, J.H., Cesare, A.J., Ozgur, S. and Griffith, J.D. (2007) Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells. *Cancer research*, **67**, 1513-1519.
- Costa, A., Daidone, M.G., Daprai, L., Villa, R., Cantu, S., Pilotti, S., Mariani, L., Gronchi, A., Henson, J.D., Reddel, R.R. *et al.* (2006) Telomere maintenance mechanisms in liposarcomas: association with histologic subtypes and disease progression. *Cancer research*, **66**, 8918-8924.
- Drenth, J. (2007) *Principles of X-ray Crystallography*. 3rd ed. Springer-Verlag New York, New York.
- Watson, J., Hays, F.A. and Ho, P.S. (2004) Definitions and analysis of DNA Holliday junction geometry. *Nucleic acids research*, **32**, 3017-3027.
- Brogden, A.L., Hopcroft, N.H., Searcey, M. and Cardin, C.J. (2007) Ligand bridging of the DNA Holliday junction: molecular recognition of a stacked-X four-way junction by a small molecule. *Angewandte Chemie*, **46**, 3850-3854.

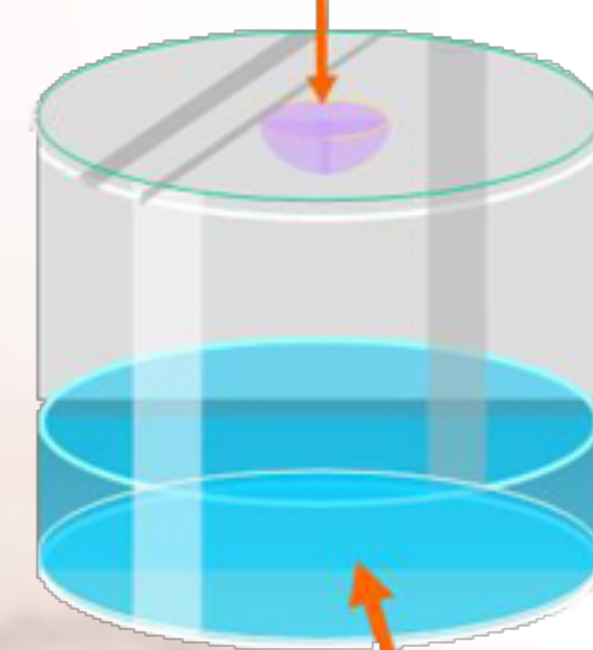
## 2. OBJETIVOS.

- Proporcionar un enfoque global de la relación entre la cristalización, la unión de Holliday y el cáncer.
- Obtener cristales de oligonucleótidos utilizando diferentes condiciones empleadas con éxito previamente, comprobando su reproducibilidad.

## 3. METODOLOGÍA.

El proceso de cristalización se realizó en placas de 24 pocillos de 1,5 cm de diámetro mediante la técnica de difusión de vapor en gota colgada. La gota se formó mezclando 2 µl de la solución de DNA con 1 µl de los 500 que conformaban el reservorio.

Cubreobjetos con la gota



Reservorio

La solución de DNA contenía dos oligonucleótidos complementarios (5'-TTAGGGTTAG-3' y 3'-ATCCCAATC-5') a 1 mM y un “buffer” compuesto por cacodilato potásico 20 mM y cloruro potásico 50 mM a pH 6,5.

El reservorio contenía una sal (MgCl<sub>2</sub> o CaCl<sub>2</sub>), cacodilato sódico y una alta concentración de agente precipitante (MPD)).



La gota de 3 µl fue colocada boca abajo en un cubreobjetos, previo engrasamiento de los bordes del pocillo.



Los platos se conservaron en una cámara a 18°C y fueron observados al microscopio durante un mes para monitorizar la formación de cristales.

La cristalización se produjo gracias al flujo de vapor desde la gota hasta el reservorio, que provocó la lenta precipitación de los oligonucleótidos en forma de cristales (8).

## 4. RESULTADOS.

En la tabla 1 se pueden observar las condiciones de cristalización ensayadas. En todos los pocillos se añadió cacodilato sódico 40 mM y concentraciones variables de MgCl<sub>2</sub> o CaCl<sub>2</sub> y MPD (2-metil-2,4-pentanodiol).

Condiciones		Resultados
1	MgCl <sub>2</sub> 50 mM, MPD 35%	Ausencia de cristales
2	MgCl <sub>2</sub> 50 mM, MPD 38%	Ausencia de cristales
3	MgCl <sub>2</sub> 50 mM, MPD 41%	Precipitado amorfo
4	MgCl <sub>2</sub> 50 mM, MPD 44%	Precipitado amorfo
5	MgCl <sub>2</sub> 50 mM, MPD 47%	Precipitado amorfo
6	MgCl <sub>2</sub> 50 mM, MPD 50%	Precipitado amorfo
7	MgCl <sub>2</sub> 150 mM, MPD 35%	Ausencia de cristales
8	MgCl <sub>2</sub> 150 mM, MPD 38%	Cristales de gran tamaño y buena calidad
9	MgCl <sub>2</sub> 150 mM, MPD 41%	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
10	MgCl <sub>2</sub> 150 mM, MPD 44%	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
11	MgCl <sub>2</sub> 150 mM, MPD 47%	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
12	MgCl <sub>2</sub> 150 mM, MPD 50%	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
13	CaCl <sub>2</sub> 20 mM, MPD 35%	Ausencia de cristales
14	CaCl <sub>2</sub> 20 mM, MPD 38%	Ausencia de cristales
15	CaCl <sub>2</sub> 20 mM, MPD 41%	Ausencia de cristales
16	CaCl <sub>2</sub> 20 mM, MPD 44%	Cristales de tamaño mediano y buena calidad
17	CaCl <sub>2</sub> 20 mM, MPD 47%	Precipitado amorfo
18	CaCl <sub>2</sub> 20 mM, MPD 50%	Precipitado amorfo
19	CaCl <sub>2</sub> 80 mM, MPD 35%	Ausencia de cristales
20	CaCl <sub>2</sub> 80 mM, MPD 38%	Ausencia de cristales
21	CaCl <sub>2</sub> 80 mM, MPD 41%	Ausencia de cristales
22	CaCl <sub>2</sub> 80 mM, MPD 44%	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
23	CaCl <sub>2</sub> 80 mM, MPD 47%	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
24	CaCl <sub>2</sub> 80 mM, MPD 50%	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad

Tabla 1. Condiciones y resultados obtenidos en la cristalización.

Los cristales de mayor tamaño y calidad se obtuvieron con las siguientes condiciones:

MgCl<sub>2</sub> 150 mM, 38% MPD

CaCl<sub>2</sub> 20 mM, 44% MPD

